Aus dem Institut für gerichtliche und soziale Medizin der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
Direktor: Professor Dr. Walcher.

Titrierungsversuche mittels der verschiedenen Methoden der Blutgruppenbestimmung.

Die Bewertung der Objektträger-, der Röhrchen- und der Kapillarmethode hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit und Zuverlässigkeit.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

überreicht von

Karl-August Eckhard
aus Oberramstadt.

Referent: Prof. Dr. K. Walcher.

1935

Carl Nieft, Buchdruckerei und Verlag, Bleicherode am Harz

Dem Andenken meines lieben Vaters.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Seit in den letzten Jahren auf dem Gebiete der Blutgruppenforschung große Fortschritte gemacht worden sind, haben sich zahlreiche Autoren auch mit der quantitativen Auswertung sowohl der Blutkörperchen- als auch der Serum-Eigenschaften befaßt. Da aber die Angaben der verschiedenen Verfasser erheblich voneinander abweichen, ist man bisher noch nicht zu völlig befriedigenden Ergebnissen gelangt. Es ist dies vor allem wohl darauf zurückzuführen, daß die einzelnen Autoren mit ganz verschiedenen Methoden unter ungleichen Bedingungen arbeiteten. Aus diesem Grunde ist es nicht möglich, die einzelnen Ergebnisse direkt miteinander zu vergleichen. Es soll nun Aufgabe dieser Arbeit sein, durch Vergleich der verschiedenen Titriermethoden auf diesem Wege einen Schritt weiterzukommen.

Bevor ich auf die einzelnen Methoden eingehe, möchte ich erst einmal erörtern, welche Faktoren allgemein bei der quantitativen Auswertung in jedem Falle, unabhängig von der Technik, konstant sind, und mit welchen variablen Größen man zu rechnen hat. Es handelt sich hier um die Receptorenempfindlichkeit der Erythrozyten und um den Agglutiningehalt des Serums.

Die agglutinierende Fähigkeit eines Serums wird bekanntlich durch Bestimmung der schwächsten Verdünnung, in der dasselbe noch fähig ist, die Agglutination einer gewissen Menge bekannter Blutkörperchen hervorzurufen, gemessen. Die Untersuchungen hierüber haben gezeigt, daß die agglutinierende Fähigkeit des Serums bei den einzelnen Individuen ganz erhebliche Schwankungen aufweist. Die Verschiedenheit ergibt sich sowohl aus der Schnelligkeit des Reaktionseintrittes als auch aus der Stärke der Agglutination und der Höhe des Endtiters. Man hat zwar gefunden (Schiff und Mendlowicz, Lehmann), daß bei ein und derselben Person der Agglutinationstiter innerhalb kürzerer Zeitabschnitte (einige Wochen oder Monate) im allgemeinen praktisch konstant bleibt. Aber die Werte bei den einzelnen Personen sind sehr verschieden und sind wohl in erhöhtem Maße vom Lebensalter abhängig. Nach Schiff und Mendowicz macht sich eine stärkere und ständige Abnahme des durchschnittlichen Agglutinationstiters erst mit dem Alter von 40 bis 50 Jahren bemerkbar. Thomsen und Kettel dagegen haben gefunden, daß sich die Serumagglutinine von der Geburt an steigend entwickeln und ihre höchste Stärke bereits in der Altersklasse von 10 Jahren erreichen. Von da an erfolge schon eine stärkere und ständige Abnahme des durchschnittlichen Agglutinationstiters, bis in den Altersklassen von 90 bis 100 Jahren Titer anzutreffen seien, die denen in der Altersklasse von ½ bis 1 Jahr nahezu entsprächen. Wenn hier auch ein gewisses System vorzuliegen scheint, so sind die Schwan-

kungen bei den einzelnen Personen doch so erheblich, daß man einen absoluten Wert oder eine konstante Größe daraus nicht errechnen kann. Es werden daher die von den einzelnen Untersuchern, die verschiedene Testsera benutzten, ermittelten Zahlen — selbst bei gleicher Technik — erheblich variieren können. Es sei hier auch noch darauf hingewiesen, daß nach den Angaben einiger Autoren der Agglutinationstiter auch durch verschiedene Krankheiten, Schwangerschaften, Bluttransfusionen oder durch Einwirkungen von Bestrahlungen usw. beeinflußt werden kann. Diese Ergebnisse haben aber noch keine allgemeine Anerkennung gefunden, weshalb sie auch hier nicht näher erörtert werden sollen.

Es ist nun von hoher Bedeutung, zu wissen, ob auch in der Receptorenempfindlichkeit der Erythrocyten ebensolche Schwankungen vorkommen. Ein Maß für den Empfindlichkeitsgrad der Erythrocyten ist in der kleinsten Menge eines bestimmten Serums zu sehen, in der sie eben noch agglutiniert werden. Man hat nun gefunden, daß schon beim Prüfen mit nur einem Serum die Empfindlichkeit der Blutkörperchen verschiedener Personen erheblich variieren kann. Schiff und Hübener haben festgestellt, daß die empfindlichsten Blutkörperchen 32 Mal empfindlicher sein können als die unempfindlichsten, jedoch fügen die genannten Verfasser hinzu, daß die extremen Werte selten sind. Es kann ein Untersucher nun zu seinen Versuchen stets die gleichen, auf ihre Empfindlichkeit geprüften Blutkörperchen verwenden, um eine feste Basis zu haben. Seine Ergebnisse haben aber immer nur einen relativen Wert. Er kann einen Titer festsetzen und diesen mit einem unter denselben Bedingungen ermittelten Titer vergleichen. Er kann eine Konstanz oder eine Veränderlichkeit des Titers einer Person ermitteln, die Abhängigkeit des Titers vom Lebensalter feststellen, eine Abnahme des Titers bei bestimmten Erkrankungen oder eine Zunahme des Titers nach einer Bluttransfusion konstatieren. Immer handelt es sich aber nur um Vergleichswerte. Unter diesem Gesichtspunkt der nur subjektiven Verwertbarkeit eines Titers steht auch die Festsetzung eines Normaltiters, der als Anhaltspunkt für die Feststellung von Senkung und Steigerung eines Titers unter verschiedenen Bedingungen dienen könnte. Die Höhe eines solchen Normaltiters ist natürlich bei jedem Untersucher verschieden und infolgedessen auch die Schlußfolgerungen aus den sich beim Vergleich mit jeweils ermittelten Titern ergebenden Unterschieden. Die Werte verschiedener Untersucher sind daher nicht unmittelbar miteinander vergleichbar. Man könnte aus einer Agglutinintiterübereinstimmung nur dann Schlüsse ziehen, wenn auch eine gleiche Receptorenempfindlichkeit der Testblutzellen vorausgesetzt werden kann. Sonst fehlt eben ein absolutes Maß im Messen der Titerstärke eines Agglutinins. Denn wenn die absolute Agglutinierbarkeit von verwendeten Blutkörperchen ebenso unbekannt ist wie das absolute Agglutinationsvermögen eines verwendeten Blutserums, so bestimmt man ja eine Unbekannte durch eine andere Unbekannte. Unter solchen Umständen könnte man sich fragen, ob es überhaupt einen Sinn hat, zu titrieren. Wenn es keine Konstante gäbe, wäre das Titrieren von Blutseren keine wissenschaftliche Methode.

Es gibt aber doch eine Erscheinung, an die man sich als Grundlage zum Titrieren halten kann. Das ist die Konstanz des Empfindlichkeitsgrades der Blutzellen, die als Testblutkörperchen Verwendung finden bei etwa 85 % erwachsener Personen, die in umfassenden systematischen Untersuchungen von Thomsen, Björum Kemp und Brahn festgestellt wurde. Thomsen und Kettel haben gezeigt, daß der Wert der Agglutinabilität, wenn das Alter der völligen Entwicklung (16. bis 20. Lebensjahr) erreicht ist, bis ins höchste Alter (100 Jahre und darüber) unverändert erhalten bleibt. Nach diesen Untersuchungen haben bei etwa 85 % aller Erwachsenen die Erythrocyten den gleichen Empfindlichkeitsgrad, bei 10 % kommen geringere Schwankungen vor, und bei den restlichen 5 % bestehen Intensitätsschwankungen beträchtlichen Grades, und zwar besonders nach unten. Solche Blutkörperchen könnten gegenüber schwachen Agglutininen leicht zu Versagern führen. Mit diesen Ergebnissen stimmen auch die Angaben von Schiff und Hübener aus dem Jahre 1926 überein. Diese Autoren fanden, daß man in der Überzahl der Fälle als Testmaterial Blutkörperchen mit einer leidlich hohen Empfindlichkeit in die Hand bekommt. In ca. 12 % der Fälle wird die Empfindlichkeit aber erheblich unter dem Durchschnitt bleiben. Es kommt also darauf an, daß als Spender von Testblutkörperchen zum Titrieren Personen lediglich aus dem Kreise jener 85 % ausgewählt werden.

Wie findet man nun Spender aus diesem Kreise von Personen mit gleich starker Agglutinabilität heraus? Man prüft die Reaktion der Blutkörperchen mit schwachen Testseren und wählt diejenigen Blutkörperchen aus, welche auch diesen schwachen Seren gegenüber noch besonders gut ansprechen. Noch zuverlässiger ist natürlich die quantitative Bestimmung. Man nimmt ein beliebiges agglutinierendes Serum und prüft, bis zu welcher Serumverdünnung die verschiedenen Blutkörperchenproben agglutiniert werden. Diejenigen Blutkörperchen, die durch die stärksten Serumverdünnungen agglutiniert werden, sind die empfindlichsten. Durch Vergleich mehrerer Blutkörperchenproben kann man die entsprechenden auswählen. Zur Kontrolle kann man diesen Versuch auch noch mit dem Serum anderer Personen wiederholen. Hierdurch erhält man also eine Konstante an die Hand, mit der man Messungen vornehmen und absolute Werte ermitteln kann.

Eine selbstverständliche Voraussetzung für ein exaktes Arbeiten ist natürlich, daß man alle Vorsichtsmaßregeln trifft, um eine Veränderung des Materials durch äußere Einflüsse zu verhindern. Die Instrumente und Apparate müssen absolut sauber sein. Als Testblut verwendet man aus den obengenannten Gründen Blut von erwachsenen und gesunden Personen. Vor allem soll das Material stets frisch verarbeitet werden. Die Serumagglutinine nehmen bekanntlich außerhalb des Körpers an Wirksamkeit allmählich ab. Wärme und Licht, sowie bakterielle Verunreinigungen beschleunigen die Abnahme. Im Eisschrank kann man jedoch ein Serum einige Monate unverändert erhalten. Die Blutkörperchen müssen vor einer zu starken Abkühlung geschützt werden, weil die Stärke der Agglutination von der Wärme abhängig ist und in der Kälte eine Agglutination auftreten kann, die in der Wärme nicht besteht. Ebenso kann bei zu lang aufbewahrten

Blutkörperchen eine unspezifische Agglutination eintreten (wahrscheinlich durch bakterielle Verunreinigung). Man kann dies durch besondere konservierende Zusätze hintanhalten. Jedoch verwendet man am zuverlässigsten frisches Material, was ja auch heute allgemein getan wird und nur der Vollständigkeit halber hier erwähnt werden soll.

Betrachtet man nun einmal die bisher veröffentlichten Ergebnisse von Titerbestimmungen, so muß man feststellen — wie schon eingangs bemerkt worden ist —, daß die ermittelten Werte bei den einzelnen Autoren erheblich voneinander abweichen. Wie oben gezeigt wurde, ist es theoretisch zwar möglich, absolute Werte zu gewinnen, die sich vergleichen lassen. Die Praxis hat das bisher aber nicht bestätigt. Der Grund dafür ist folgender: Die Höhe eines Titers hängt einmal von der Art und Weise ab, wie die Agglutinationsreaktion angestellt wird, und zum andern, wie das Resultat abgelesen wird. Es ist für die erhaltenen Endtiter nicht gleichgültig, ob man den Versuch auf dem Objektträger oder im Reagenzglas oder im Kapillarröhrchen oder in sonst einem Verfahren anstellt. Verschiedene Methoden ergeben verschiedene Resultate. Ausschlaggebend ist es ferner, mit welchen Mengenverhältnissen innerhalb dieser Methoden gearbeitet wird. Wenn man bei gleicher Methodik verschiedene Verdünnungsgrade anwendet, wird man natürlich auch verschiedene Zahlenwerte erhalten. Außerdem ist von großem Einfluß die Art, wie das Ergebnis abgelesen wird, weil einmal in den Grenzstufen ein subjektives Moment sich vielfach nicht vermeiden läßt. Vor allem aber ist es entscheidend für das Endergebnis, ob mit bloßem Auge oder mit der Lupe oder unter dem Mikroskop, oder ob der Titer nach Zentrifugieren oder ohne vorheriges Zentrifugieren abgelesen wird. Dazu kommt noch, daß der Zeitpunkt der Ablesung sehr verschieden gewählt werden kann. Von den meisten Autoren hat jeder seine besondere Art, zu titrieren, wodurch sich also die verschiedenen Ergebnisse erklären. Vielfach wurden nun gerade aus dem Bestreben heraus, diese Mängel zu beseitigen, wieder neue Wege gesucht und neue Methoden versucht, was das Bild noch uneinheitlicher machte.

Die bisher am meisten angewandten Methoden zur Ausführung der Agglutinationsreaktion sind die Objektträgermethode und die von Schiff angegebene Reagenzglasmethode. Das Grundprinzip ist für alle Verfahren gleich: Man bringt bekanntlich in ein unbekanntes Serum eine bestimmte Menge bekannter Blutkörperchen oder umgekehrt und sieht zu, ob und wann eine Agglutination eintritt. Um nun hierfür optimale Bedingungen zu erreichen, hat man die verschiedensten Modifikationen der Versuchsanordnung angewandt. Schiff geht bei seiner Methode so vor (die Technik im einzelnen wird unten bei der Besprechung meiner Versuche angegeben), daß er das Serum-Blutkörperchengemisch nach Umschütteln einige Minuten stehen läßt und dann 3 Minuten zentrifugiert. Nach seinen Angaben ist dann das Reaktionsmaximum sofort erreicht. Eine Ablesung bei starker Vergrößerung lehnt Schiff ab, weil dann eine scharfe Abgrenzung positiver und negativer Reaktionen nicht möglich sei. Seine Resultate sind im allgemeinen wesentlich höher als die anderer Autoren. Das führt Schiff auf die höhere Empfindlichkeit seiner Technik zurück, zum Teil vielleicht auch auf die besondere Auswahl der Testblutkörperchen. Hölscher und Zantop halten sich zwar ziemlich genau an die von Schiff angegebene Technik, aber sie schleudern die Röhrchen nicht aus, sondern stellen sie zwei Stunden in den Brutschrank bei 37 °, weil diese Temperatur am günstigsten für die Agglu-

tination sei und weil sie mit Dölter den Standpunkt teilen, daß dadurch unspezifische Agglutinationen weitgehend vermieden werden. Hölscher findet, daß durch das Aufschütteln, das beim Ablesen der Agglutination im Röhrchen nötig ist, eine genaue Abgrenzung von positiver und negativer Reaktion sehr erschwert wird. Wenn man stark aufschüttelt, so werden schwache Agglutinationen wieder völlig aufgelöst, und man erhält dadurch viel niedrigere Werte, und umgekehrt werden sich bei schwachem Aufschütteln die Ergebnisse nach oben verschieben. Zur besseren Abgrenzung der Endwerte liest Hölscher deshalb mit der Lupe ab. Er stellt aber fest, daß man bei mikroskopischer Ablesung noch höhere Werte finden kann. Das subjektive Moment spielt also hierbei eine große Rolle. Fischer nun wieder setzt seine Versuche im Uhlenhuthröhrchen an und hält sie nur 60 Minuten im Brutschrank bei 37 °, wobei er sie in regelmäßigen Abständen durchschüttelt. Er liest sofort nachher ab und außerdem noch drei Mal bei Zimmertemperatur. Aus diesen 4 Werten berechnet er dann einen Mittelwert. Zum Vergleich wendet Fischer auch die Schiff'sche Zentrifugiermethode an und findet, daß hierbei der Titer zwar höher ist, es würden aber bei der Zentrifugiertechnik die Fehler wie Pseudo- und Panagglutination vermehrt. Bei der mikroskopischen Kontrolle findet er meist eine 1 bis 2 Röhrchen weiterreichende Agglutination als bei der makroskopischen Untersuchung.

Holzer titriert nach dem Objektträgerverfahren auf Hohlschliffplatten. Seine Untersuchungen gehen jedoch in einer anderen Richtung, so daß sie hier nicht zum Vergleich angeführt werden können. Schrader titriert auch auf dem Objektträger und liest das Ergebnis mikroskopisch ab. Er bewertet aber nur Agglutinationen, die innerhalb 5 Minuten deutlich zu erkennen waren. Diese Reaktionszeit ist aber für die Objektträgermethode erfahrungsgemäß zu kurz. So erhält er auch sehr schwankende Werte und einen sehr niedrigen Mittelwert. Lauer findet auch, daß man bei der Schiff'schen Reagenzglasmethode sehr leicht in ein Gebiet kommt, wo man im Zweifel sein kann, ob man eine schwach positive oder eine negative Reaktion vor sich hat. Diese Zone der ± Reaktion läßt sich nach seiner Ansicht nur durch ein Objektträgerverfahren mit teils makroskopischer und teils mikroskopischer Ablesung unterteilen. Als besonderen Vorteil dieses Verfahrens betont er, daß man dabei den Vorgang der Agglutination zeitlich verfolgen kann und nicht lediglich auf die Beurteilung eines Endzustandes angewiesen ist. Bei der Objektträgermethode sähe man eine absolut scharfe Grenze zwischen positiver und negativer Reaktion, während die Reagenzglasmethode bereits seit zwei oder mehr zurückliegenden Stufen ± angezeigt haben kann. Dieselben Feststellungen machen auch Schött, Shigeno u. A. Bei Shigeno der auch makroskopisch und mikroskopisch abliest, kommt noch hinzu, daß er die mikroskopische Untersuchung erst sehr viel später vornimmt, so daß schwach positive Reaktionen wieder geschwunden sein konnten, was er selbst auch angibt. Da er aber nur die mikroskopischen Werte festlegt, weil die makroskopische Ablesung in den Grenzgebieten weniger zuverlässig sei, so werden hierdurch natürlich die Ergebnisse auch beeinflußt sein. Weber, der bei seinen Untersuchungen genau wie Schiff verfährt, erhält viel niedrigere Titerwerte als die allgemein angegebenen. Das hat seinen Grund darin, daß das Verhältnis von Serumverdünnung und Blutzellenaufschwemmung verschieden ist und nicht der absolute Verdünnungsgrad berechnet wurde. Weber verdünnt 2 Tropfen Serum mit 4 Tropfen Blutkörperchenaufschwemmung und nimmt dies als Norm $^1/_1$ an. Der absolute Verdünnungsgrad ist aber in Wirklichkeit $^1/_4$. Schiff und

Mendlowicz dagegen verdünnen 4 Tropfen Serum mit 2 Tropfen Blut und nehmen diese viel schwächere Verdünnung auch als Norm 1 : 1 an, während der absolute Verdünnungsgrad $^1/_{1,5}$ ist (vergleiche hierzu weiter unten die Tabelle in Abbildung 3). Daß die letztgenannten Autoren dann entsprechend (wenn auch nur relativ) höhere Werte erhalten, liegt auf der Hand. Ähnlich liegen die Verhältnisse bei den Untersuchungen von Thomsen und Kettel. Sie verwenden Serum und Blutkörperchen zu gleichen Teilen, geben aber als Titer den Verdünnungsgrad des Serums ohne Blutkörperchenzusatz an. Sie bemerken ja auch selbst, daß es korrekter gewesen wäre, den Titer mit dem zweifachen Werte anzugeben, weil die Serumkonzentration ja durch Zugabe der Blutkörperchensuspension auf die Hälfte herabgesetzt wird. Da es ihnen aber nur auf die relativen Werte ankam, haben sie davon Abstand genommen. Als Besonderheit ihrer Technik sei hier noch angeführt, daß Thomsen und Kettel die Röhrchen, ohne zu zentrifugieren, 4 Stunden bei Zimmertemperatur von 20 bis 22° stehen lassen und dann mit der Lupe bei durchfallendem Licht ablesen. Die Zentrifugiermethode hat nach den Untersuchungen dieser Autoren nur den einen Vorteil, daß das Reaktionsmaximum sogleich erreicht wird, während das Resultat selbst dasselbe bleibt wie nach einfachem vierstündigen Stehen. Ein Vergleich dieser verschiedenen Untersuchungsergebnisse ist nur so möglich, daß man die einzelnen Ergebnisse auf die absoluten Verdünnungsgrade umrechnet. Darauf hat Zantop schon hingewiesen und hat in umständlichen Rechnungen die Faktoren ermittelt, mit denen man die Ergebnisse verschiedener Autoren multiplizieren muß, um ihre Ergebnisse vergleichen zu können. Da aber bei der Multiplikation mit den verschiedenen Faktoren verschiedene absolute Vergleichswerte herauskommen, macht ein genauer Vergleich der Arbeiten trotzdem noch gewisse Schwierigkeiten. Zantop steht daher auf dem Standpunkt, daß eine Standardisierung der Methodik sehr zu begrüßen wäre, um die Möglichkeit zu schaffen, die Ergebnisse verschiedener Arbeiten direkt miteinander vergleichen zu können.

Dieser Überblick über die bisherigen Erfahrungen auf diesem Gebiete zeigt, wie sehr diese noch auseinandergehen. So verschieden die angewandte Methodik bei den einzelnen Autoren ist, so verschieden sind auch die Ergebnisse. Man kann daher sehr wohl auf den Gedanken kommen, daß es gar keinen Zweck hat, genaue Titerzahlen zu bestimmen. Die Angabe einer Zahl sagt bei der jetzt herrschenden Verschiedenheit der Methodik nicht mehr als die Angabe, daß es sich bei diesem oder jenem Serum um ein schwach oder stark agglutinierendes handelt. Gäbe es absolute Werte bei der Titerbestimmung wie ein Gewicht in g oder ein Maß in cm etc., dann hätte es Sinn, einen Titer zahlenmäßig auszudrücken.

Da es aber, wie oben gezeigt wurde, prinzipiell möglich ist absolute Werte zu gewinnen, haben wir den Versuch unternommen, mit den verschiedenen Methoden gleichzeitig unter gleichen Bedingungen und einheitlichen Voraussetzungen zu titrieren, mit der Absicht, die verschiedenen Methoden sich gegenüberstellen und sie gegeneinander abwägen zu können. Mit dem gleichen Ziel ist bereits 1925 eine russische Arbeit von Rubaschkin veröffentlicht worden mit dem Titel: „Die vergleichende Beurteilung der Methoden der Haemoisoagglutination". Diese Arbeit ist aber heute nicht mehr von großem Interesse, denn die Methoden, die Rubaschkin vergleicht sind die Objektträgermethode und die Deckglasmethode am hängenden Tropfen, die aber nichts anderes ist als eine Objektträgermethode in

der feuchten Kammer. Es sind also im Grunde zwei gleiche Methoden, die er vergleicht, von denen eben die zweite nur eine Variation der ersten darstellt. Rubaschkin kommt zu dem Ergebnis, daß bei der einfachen Objektträgermethode die Flüssigkeit meistens schon eintrockne, bevor die Agglutination eingetreten sei, so daß hierbei zahlreiche Fehlbestimmungen vorkämen. Deshalb sei die Bestimmung in der feuchten Kammer unter allen Umständen vorzuziehen. Da nun auch die Untersuchungen auf erbbiologischem Gebiete mit der Objektträgermethode gemacht seien, kommt er zu dem Schluß, daß auch hier große Fehler unterlaufen und daher auf diesem Gebiete große Reformen notwendig seien. Da aber in dieser Arbeit die modernen Verfahren nicht berücksichtigt sind und auch nicht berücksichtigt sein können, hat diese Arbeit heute keine wesentliche Bedeutung mehr.

Die bis jetzt bewährten Methoden, mit denen auch ich meine Untersuchungen angestellt habe, sind die Objektträgermethode, die Schiff'sche Reagenzglasmethode und die vor 2 Jahren von Ponsold angegebene Kapillarröhrchenmethode. Außer diesen Methoden ist von Pikkarrainen und Suominen noch ein besonderes Verfahren zur Bestimmung des Isoagglutinintiters in Pipetten beschrieben worden. Diese Autoren gingen von der Erwägung aus, daß die übliche Titriermethode im Röhrchen ziemlich unzuverlässig sei, da dabei das Ablesen an der Titergrenze sehr schwierig sei und die Ergebnisse durch das durch den Prüfenden bedingte subjektive Moment beeinflußt würden. Pikkarrainen und Suominen stellen in abfallenden Konzentrationen Serum-Blutkörperchengemische her und saugen diese in Pipetten auf. Sie beobachten dann das Absinken der Blutkörperchen in den Pipetten von dem Gesichtspunkte aus, daß Agglutinate rascher absinken als isolierte Blutkörperchen. Sie untersuchen, ob mit der Lupe eine Agglutination wahrnehmbar ist. Die Entscheidung treffen sie aber in erster Linie nach der Höhe der sich am Pipettenboden bildenden Blutkörperchensäule, wobei eine Minimalhöhe dieser Säule festgelegt werden müsse, bis zu der eine Agglutinationsreaktion als positiv zu bewerten sei. Durch ein starkes Agglutinat kann aber sehr leicht das Pipettenlumen verstopft und durch den entstehenden Hohlraum die Säule künstlich erhöht werden. Da dieses Verfahren also auf ziemlich unsicheren Füssen steht, ist es von mir nicht angewandt worden, insbesondere wo die Urheber dieser Methode selbst zugeben, daß sie noch recht unvollkommen sei. Ich beschränke mich also auf die obengenannten drei Methoden.

Bevor ich nun auf meine Ergebnisse eingehe, möchte ich noch kurz die von mir bei den einzelnen Verfahren benutzte Technik angeben.

I. Die Objektträgermethode.

Hierfür habe ich Porzellanplatten mit hohlgeschliffenen Vertiefungen verwandt. Für die erste Stufe wurden 2 Tropfen unverdünnten Serums genommen. In die folgenden Näpfchen wurden zunächst 2 Tropfen physiologischer Kochsalzlösung gebracht. Zu der Kochsalzlösung in der zweiten Nische wurden dann 2 Tropfen des auszuwertenden Serums gegeben. Die beiden Flüssigkeiten wurden nun durch mehrmaliges Aufziehen und Ausblasen in der Tropfpipette unter gleichzeitigem Umrühren gemischt. Diese Mischung wurde dann in die Pipette aufgesogen und 2 Tropfen davon in die nächste Vertie-

fung übertragen. Der Rest wurde wieder zurückgetropft. In der gleichen Weise wurde dann von Napf zu Napf weiter verdünnt, so daß eine nach den Potenzen von 2 fortschreitende Verdünnungsreihe entstand. In Zahlenverhältnissen ausgedrückt ergeben sich folgende Werte: In der ersten Mulde $^1/_1$ (unverdünntes Serum), in der zweiten $^1/_2$ (Serum + gleiche Menge NaCl), in der dritten $^1/_4$ ($^1/_2$ verdünntes Serum + gleiche Menge NaCl), dann $^1/_8$, $^1/_{16}$ etc. Jedem Napf wurde dann ein Tropfen einer 1 %igen frisch bereiteten Blutkörperchenaufschwemmung hinzugegeben. Die endgültige Verdünnung im ersten Napf ist dann 1/1,5 (2 Tropfen Serum + 1 Tropfen Blutkörperchenaufschwemmung), im zweiten $^1/_3$ (2 Tropfen Serum + 2 Tropfen NaCl + 1 Tropfen Blutkörperchen), dann $^1/_6$, $^1/_{12}$ und im zehnten schließlich $^1/_{768}$. Die Platten wurden dann, nachdem gut durchmischt war, 4 Stunden in eine feuchte Kammer gestellt und danach die Ergebnisse makroskopisch und mikroskopisch auf dem Objektträger abgelesen.

II. Schiff'sche Reagenzglasmethode.

Hier wurde genau nach der Titriermethode von Schiff und Mendlowicz verfahren. Die Verdünnungsreihe in den Röhrchen wurde in der gleichen Weise hergestellt wie bei dem Objektträgerverfahren, nur wurden die Mengenverhältnisse entsprechend den Angaben von Schiff anders gewählt. 4 Tropfen Serum wurden steigend mit 4 Tropfen physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, so daß zunächst die Verdünnungen die gleichen wie bei der Objektträgermethode sind, nämlich $^1/_1$ (unverdünnt), $^1/_2$, $^1/_4$ etc. Dazu werden dann in jedes Röhrchen 1 Tropfen Blutkörperchenaufschwemmung gegeben. Die endgültige Verdünnung ist dann also im ersten Röhrchen $^1/_{1,25}$ (4 Tropfen unverdünntes Serum + 1 Tropfen Blutkörperchen), im zweiten Röhrchen $^1/_{2,5}$ (4 Tropfen Serum + 4 Tropfen NaCl + 1 Tropfen Blutkörperchen), dann $^1/_5$, $^1/_{10}$ usw..... und schließlich beim zehnten Röhrchen $^1/_{640}$. Die Röhrchen wurden gut durchgeschüttelt, einige Minuten bei Zimmertemperatur stehengelassen und dann 2 Minuten zentrifugiert. Die Ablesung erfolgte ebenfalls makroskopisch und mikroskopisch auf dem Objektträger.

III. Die Kapillarmethode.

Nach den Angaben von Ponsold bin ich folgendermaßen vorgegangen: Es wurden Glaskapillarröhrchen von etwa 10 cm Länge und einer lichten Weite von etwa 1 mm benutzt. Durch die Kapillarattraktion saugt sich beim Eintauchen der Kapillaren die Flüssigkeit selbsttätig auf. Die Kapillarröhrchen wurden höchstens bis zur Hälfte angefüllt, damit genügend Spielraum zum Hin- und Herführen der Flüssigkeit in der Kapillare vorhanden war, was für ein gutes Durchmischen der aufgesogenen Flüssigkeiten erforderlich ist. Die Kapillaren werden in besonderen, praktischen Gestellen aufgelegt, die Ponsold eigens hierfür hat anfertigen lassen (siehe dazu M. m. W. 1933, Nr. 41, S. 1594). Das Titrieren selbst geht in den Kapillaren folgendermaßen vor sich: In die erste Kapillare saugt man eine kleine Serummenge auf und markiert mit Tinte den Punkt, bis zu dem die Flüssigkeit reicht. Dabei ist natürlich darauf zu achten, daß die Flüssigkeit genau mit dem Ende der Kapillare abschneidet. Dann mißt man die doppelte Länge dieser Serumsäule aus und markiert auch diesen Punkt, bis zu dem dann die Verdünnungsflüssigkeit aufgesogen wird. Das Serum

ist dann auf die Hälfte verdünnt. In der ersten Kapillare nimmt man unverdünntes Serum und gibt zu gleichen Teilen Blutkörperchenaufschwemmung zu. Das Verdünnungsverhältnis ist also $^1/_2$. In der zweiten Kapillare wird wieder Serum aufgesogen und dann zu gleichen Teilen physiologische Kochsalzlösung nachgesaugt, nachdem die Punkte wie oben markiert sind. Diese beiden Flüssigkeiten werden nun gut durchgemischt (Technik siehe unten). Dann läßt man von dieser Verdünnung die Hälfte in eine dritte Kapillare überfließen. Auch auf dieser markiert man wieder die einfache und die doppelte Länge der Flüssigkeitssäule, verdünnt mit NaCl, mischt und überträgt wieder auf die nächste Kapillare usw. bis zur letzten, bei der man die Hälfte der Verdünnung wegfließen läßt. In die Kapillaren, die jetzt nur bis zum ersten Punkt gefüllt sind, wird nun bis zur zweiten Marke Blutkörperchenaufschwemmung aufgesogen. Dadurch wird also noch einmal um die Hälfte verdünnt. Im ersten Kapillarröhrchen befindet sich demnach unverdünntes Serum + Blutkörperchenaufschwemmung ana, was einer Verdünnung $^1/_2$ entspricht. In der zweiten Kapillare haben wir Serum + NaCl ana (= $^1/_2$). Dazu kommt noch die gleiche Menge Blutkörperchen, so daß die endgültige Verdünnung $^1/_4$ ist. Die nächsten Stufen sind dementsprechend: $^1/_8$, $^1/_{16}$ usw. und schließlich in der zehnten $^1/_{1024}$. Den Zu- oder Abfluß in den Kapillaren kann man durch Zuhalten ihres einen Endes regulieren oder dadurch, daß man sie mehr bezw. weniger steil hält. Wird eine Flüssigkeit zu einer bereits aufgezogenen Flüssigkeit in die Kapillare gebracht, so muß man darauf achten, daß die zuerst eingeführte Lösung genau mit dem Ende an der unteren Öffnung der Kapillare abschneidet, weil sonst beim Aufziehen der zweiten Flüssigkeit eine Luftblase zwischen beide Lösungen gerät, wodurch dann das Mischen erheblich erschwert wird. Das Mischen von Serum und Blutkörperchen in der Kapillare geschieht dadurch, daß man zunächst die Kapillare senkrecht hält, wobei die Blutkörperchen sich nach unten senken. Nach einiger Zeit dreht man dann die Kapillare um 180° und läßt die Blutkörperchen in entgegengesetzter Richtung absinken. Das macht man mehrmals; jedoch ist ein zwei- bis dreimaliger Lagewechsel schon ausreichend. Während des Ablesens muß diese Mischung aufrecht erhalten werden durch Hin- und Herschieben der Flüssigkeitssäule oder durch Drehen der Kapillare um ihre Längsachse in Horizontallage.

Zu meinen Untersuchungen benutzte ich Sera, die aus den zur Anstellung der Wassermannschen Reaktion ins Hygienische Institut eingegangenen Blutproben der hiesigen Kliniken gewonnen waren und mir vom Hygienischen Institut in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt wurden. Sämtliche Sera wurden stets frisch oder spätestens nach eintägiger Aufbewahrung im Eisschrank ausgewertet, und zwar gleichzeitig mit allen drei angegebenen Methoden. Die Testblutkörperchen wurden immer frisch entnommen am Untersuchungstage und stammten stets von denselben, gesunden Personen, die auch am hiesigen Institut für forensische Untersuchungen als Spender verwendet werden. Da für alle drei Methoden innerhalb eines Versuches stets dasselbe Material benutzt wurde, so sind ja von vornherein die Bedingungen für jedes Verfahren gleich, so daß die Ergebnisse unbedenklich einander gegenübergestellt werden können. Ich habe aber trotzdem die Bedingungen so einheitlich gewählt, daß sowohl alle Versuche untereinander gleichgestellt sind als auch meine Untersuchungen mit anderen, die eventuell in der gleichen Richtung gemacht werden, direkt verglichen werden können. Das Testblut wurde nach Einstich in das Ohrläppchen mit einer Blutkörperchenzählpipette aufgezogen und mit einer 0,76 %igen Zitratkochsalzlösung eine 1 %ige

Verdünnung hergestellt. Diese Suspensionsdichte habe ich der der Einheitlichkeit halber bei allen Versuchen durchweg verwandt. Dies liegt einmal innerhalb der üblichen Grenzen: Schiff gibt als Optimum für seine Methode eine 1 bis 2,5 % ige Aufschwemmung an, wobei er noch hinzufügt, daß eine dünne Aufschwemmung weniger bedenklich ist als eine zu starke Konzentration, und Ponsold für seine Kapillarmethode eine 1 % ige. Zum anderen konnte ich diese Konzentration unbedenklich wählen, da es durch die Untersuchung zahlreicher Autoren erwiesen ist, daß die Dichte der Blutzellenaufschwemmung innerhalb ziemlich weiter Grenzen, von 1 bis 10 %, ohne Einfluß auf das Titerergebnis ist. Davon habe ich mich auch selbst durch eine Reihe von Versuchen überzeugt, wobei ich allerdings feststellte, daß bei einer 10 % igen Aufschwemmung das Ablesen durch die Dichte der Suspension schon wesentlich schwieriger wird. Das trifft in besonderem Maße für die Kapillarmethode zu. Auf der anderen Seite darf man natürlich die Erythrocytenaufschwemmung nicht beliebig weit verdünnen, weil dann Agglutinationen auch noch bei stärkeren als den bisher angewandten Serumverdünnungen erfolgen. Es kann keine Titration ausgeführt werden, wenn entsprechend einer Serumverdünnung auch eine so geringe Anzahl von Testblutkörperchen angeboten wird, daß die in der Serumverdünnung enthaltene Agglutininmenge noch ausreicht, um eine Agglutination zu bewirken. Es muß vielmehr beim Titrieren an einem Punkt ein Überangebot an Blutkörperchen erfolgen in Bezug auf die wirksame Menge des Serums. Dann werden zwar auch einige wenige Blutkörperchen agglutiniert werden. Sie werden aber im Übermaß der nicht agglutinierten untertauchen und sich beim Ablesen der Wahrnehmung entziehen. Oder aber es kommt überhaupt nicht mehr zu einer Agglutination, da die geringen Agglutininmengen von den relativ sehr zahlreichen Blutkörperchen absorbiert werden, so daß die Agglutininmenge, die auf das einzelne Blutkörperchen kommt, zu gering ist, um eine Agglutination zu ermöglichen. Dieser Punkt bezw. diese Verdünnungsstufe wird dann als negativ bezeichnet. Die Feststellung ausbleibender Agglutination beruht also immer nur darauf, daß zur wirksamen Serummenge relativ zuviel Blutkörperchen zugesetzt worden sind. Wenn man nun umgekehrt zu einer Serumverdünnung eine entsprechend starke Blutzellenverdünnung hinzugibt, wird man nie einen Punkt erhalten, an dem keine Agglutination mehr eintritt. Ein Titrieren wäre dann unmöglich.

Die Anzahl der beim Titrieren hinzugesetzten Blutkörperchen beruht also auf einer willkürlichen Übereinkunft. Die Grenzen der vereinbarten Konzentrationen liegen zwischen 1 bis 10 %. Innerhalb dieser Grenzen tritt bei der üblichen Methodik keine Beeinflussung eines Titers ein, denn die Serumkonzentration nimmt von Stufe zu Stufe um 100 % ab. Bei diesen gewaltigen Konzentrationsunterschieden geben Schwankungen der Blutkörperchendichte zwischen 1 und 10 % nicht einen solchen Ausschlag, daß sich das Ergebnis um eine Stufe verschieben könnte. Das kann man sich theoretisch an einer graphischen Darstellung klarmachen, wie es die Abbildung 1 zeigt. Die einzelnen Punkte dieser Kurve sind nicht mathematisch festgelegt, sondern willkürlich angenommen, sie sollen ja nur die obigen Erwägungen veranschaulichen.

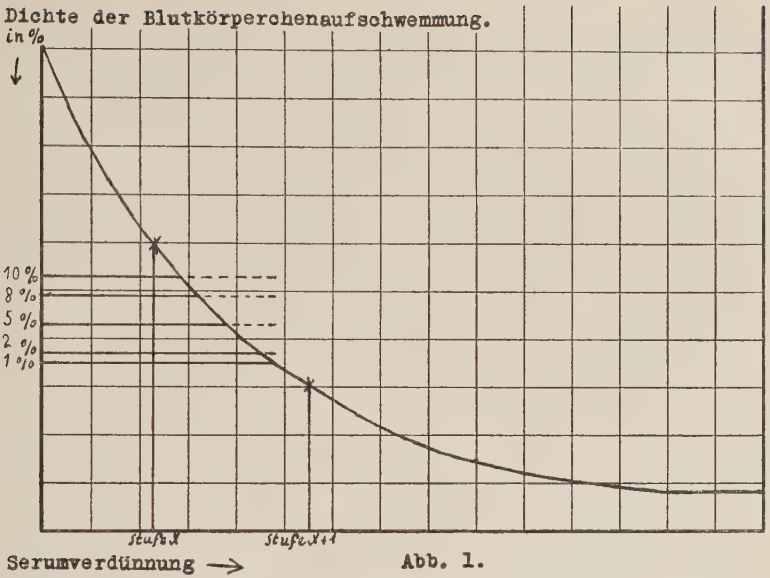

Abb. 1.

Zur Erklärung für den Verlauf dieser Kurve diene noch folgendes: Setze ich einem Serum eine relativ sehr dichte Blutkörperchenaufschwemmung zu, so erhalte ich — wie oben erwähnt — keine oder keine sichtbar in Erscheinung tretende Agglutination. Lasse ich die Serum- und die Blutkörperchenverdünnung stetig fortschreiten, so erhalte ich eine abfallende Kurve, die immer flacher und schließlich der Abzisse parallel wird, wenn die Erythrocytenverdünnung so stark ist, daß ich keinen Punkt mehr erhalte, an dem die Agglutination ausbleibt. Eine solche Verlaufsrichtung habe ich also der willkürlich angenommenen Kurve gegeben. Auf der Abszisse sind zwei Stufen der in gleichmäßigen Abständen fortschreitenden Serumverdünnungen eingezeichnet, die Ordinate gibt die Blutkörperchendichte in Prozenten an. Aus der Kurve geht hervor, daß die 10 % ige Aufschwemmung eine nicht ganz so weitgehende Agglutination macht als die 1 % ige. Der Unterschied ist aber nicht so groß, daß er über den Bereich einer Stufe hinausgeht. Die gestrichelten Linien zeigen die Differenz der Ergebnisse bei den verschiedenen Erythrocytenkonzentrationen.

Wenn also innerhalb so weiter Grenzen Schwankungen in der Blutkörperchendichte ohne Einkluß auf das Endergebnis sind, so ist es auf jeden Fall belanglos, ob ein Autor mit einer 1 % igen oder einer 2 % igen Aufschwemmung titriert. Ich habe mich daher der Einheitlichkeit halber für alle Versuche — wie gesagt — einer 1 % igen Aufschwemmung bedient.

Das Ablesen der Ergebnisse handhabte ich so, daß ich bei allen Versuchen grundsätzlich außer den makroskopischen auch die mikroskopischen Werte festlegte. Schiff lehnt zwar eine mikroskopische Untersuchung ab, da es sich auf diese Weise nicht sicher nachweisen lasse, ob eine Agglutination noch positiv sei oder nicht. Ich bin aber der Ansicht, daß für eine quantitative Auswertung eine mikroskopische Ablesung unerläßlich ist, da man dadurch erst die

absolute oberste Grenze von positiver Reaktion feststellen kann, die oft erheblich über dem makroskopischen Werte liegt, und die Ablesung mit bloßem Auge individuell recht verschieden sein kann. Das trifft in erster Linie für die Reagenzglasmethode zu.

Bei dieser nehme ich das Ablesen folgendermaßen vor: Nach dem Zentrifugieren sitzen die Blutkörperchen in allen Röhrchen gleichmäßig als Satz am Boden, über dem eine klare Flüssigkeit steht. Zum Ablesen schüttelt man den Bodensatz vorsichtig auf. Das ist in den Anfangsstufen, wo die Agglutination sehr kräftig ist, ganz einfach. Das Agglutinat wird als dicke Flocke aufgewirbelt, oder es zerfällt in mehrere kleine Flöckchen. Bald kommt man jedoch an eine Stufe, bei der es von der Stärke des Schüttelns abhängt, ob die Agglutinate sichtbar bleiben oder nicht. Schüttelt man stark auf, so kann man eine mittelstarke Agglutination völlig zum Schwinden bringen. Wirbelt man aber den Bodensatz nur durch vorsichtiges Klopfen gegen die Wandung des Röhrchens auf, so kann man noch mehrere positive Stufen erhalten. Man hat dabei ein Gefühl der Unsicherheit. Es hängt ganz von dem einzelnen Untersucher ab, ob er eine Reaktion noch als positiv bezeichnen will oder nicht. Man muß daher nach einer Möglichkeit suchen, die es gestattet, diese unsicheren Grenzgebiete genau in positiv oder negativ zu trennen. Etwas weiter hilft einem dabei das Vergleichen mit Röhrchen mit sicher negativer Reaktion. Oder man läßt einen Finger gegen das Röhrchen schnellen, wodurch der Inhalt hochgeworfen wird. Beim Herunterlaufen an der Wandung sieht man dann deutlicher, ob Agglutinate da sind oder nicht. Ich habe als makroskopischen Endtiter immer nur die Stufe aufgezeichnet, die ich mit bloßem Auge noch einwandfrei als positiv bezeichnen konnte. Den Inhalt der nächsten Röhrchen brachte ich dann auf einen Objektträger und untersuchte unter dem Mikroskop. Im allgemeinen fällt dabei eine Entscheidung nicht schwer. In zweifelhaften Fällen habe ich mir dadurch geholfen, daß ich das Deckglas einmal kurz aufhob und gleich wieder fallen ließ. Bei Pseudoagglutinationen stieben dann die Erythrocyten auseinander, während echte Agglutinationen bestehen bleiben. Oder ich beseitigte Pseudoagglutinationen dadurch, daß ich die Flüssigkeit mehrmals in eine Pipette aufzog und wieder ausspritzte. Eine recht gute Beschreibung des Unterschiedes zwischen echten und Pseudoagglutinationen gab mir ein Laie, den ich unvoreingenommen beide Formen nebeneinander ansehen ließ: „Auf dem einen Objektträger (mit echten Agglutinationen) liegen sie (die Erythrocyten) ganz dicht beieinander und lassen keine Zwischenräume zwischen sich, auf dem anderen Objektträger dagegen berühren sie sich gerade so eben, aber es ist ein kleiner Zwischenraum zwischen den einzelnen Körperchen; sie liegen nur so zufällig beieinander".

Bei der Objektträgermethode liegen die Verhältnisse wesentlich günstiger. Abgelesen habe ich nach vierstündigem Stehen bei Zimmertemperatur. Bei diesem Verfahren bietet jedoch die Flüssigkeit der Luft eine große Angriffsfläche, so daß schnell eine Verdunstung und Eintrocknung eintritt. Diese kann man jedoch durch Einbringen der Hohlschliffplatten in eine feuchte Kammer soweit hintanhalten, daß sie erst eintritt, nachdem das Reaktionsmaximum erreicht ist. Vor dem Ablesen habe ich durch Hin- und Herbewegen der Hohlschliffplatte die Flüssigkeiten noch einmal gut durchmischt. Bei positiver Reaktion finden sich die Agglutinate meist am Rande, während die nicht zusammengeballten Erythrocyten sich im Zentrum sammeln. Bei stetigem Hin- und Herschütteln bereitet das Ablesen keine großen Schwierigkeiten. Die mikroskopische Untersuchung ergab meistens

noch eine positive Stufe mehr. Diese kann man nicht mehr mit blossem Auge erkennen, weil man sie nicht bei durchfallendem Licht betrachten kann, und weil bei schwacher Reaktion an der Oberfläche mehr oder weniger zahlreiche nicht zusammengeballte Erythrocyten schwimmen, die die darunter liegenden feinen Agglutinate verdecken.

Auch beim Ablesen in der Kapillare muß man den Inhalt zunächst noch einmal tüchtig mischen. Das geschieht in der oben geschilderten Weise. Das Durchmischen in der Kapillare ist so intensiv, daß die Reaktion schnell eintritt. Pseudoagglutinate kommen dabei entweder gar nicht zustande, oder sie zerstieben gleich wieder. Haben sich bei längerem Stehen Pseudoagglutinate in der Kapillare gebildet, so sieht man beim Hin- und Herbewegen der Flüssigkeit in der Kapillare, daß diese Pseudoagglutinate sich sehr bald zerkleinern und ganz auflösen. Echte Agglutinate bleiben dagegen auch bei intensivem Mischen bestehen, oder vergrößern sich sogar noch. Zum Ablesen hält man die Kapillare wagrecht und dreht sie langsam um ihre Längsachse. Dabei beobachtet man das Sedimentieren der Blutkörperchen. Man muß so schnell drehen, daß die Blutkörperchen dauernd in Bewegung bleiben und sich nicht am Boden absetzen. Im Gegensatz zu den anderen Methoden sind auch schwache Agglutinationen sehr deutlich zu beobachten, da sie bei dem engen Lumen nicht so leicht in der Aufschwemmungsflüssigkeit untertauchen, und weil sie durch die besondere Art des Mischens dauernd übereinander geschichtet werden und dadurch größtmögliche Ausmaße annehmen. Während man sich bei der Röhrchenmethode in den Grenzgebieten positive Agglutinationen suggerieren kann, hat man bei der Kapillarmethode ein Gefühl der Sicherheit. Das Reaktionsmaximum tritt bei der Kapillarmethode sehr bald ein und ist bei gutem Durchmischen in wenigen Minuten voll ausgeprägt. Ich habe aber trotzdem immer erst nach vierstündigem Stehen abgelesen und festgestellt, daß man dabei keine höheren Endwerte erhält als beim Ablesen nach wenigen Minuten. Es ist höchstens in einigen Fällen eine Reaktion, die anfangs nur mit der Lupe erkennbar war, später auch noch für das bloße Auge sichtbar geworden, aber einen höheren absoluten Endwert habe ich auch nach längerem Stehen nie beobachtet. Das Eintrocknen spielt bei der Kapillare praktisch keine Rolle. Man kann noch nach 1 bis 2 Tagen die Ablesungen einwandfrei wiederholen. Ponsold konnte sogar bei besonderen Vorsichtsmaßnahmen noch nach einer Woche und länger die Reaktion wieder zur Darstellung bringen. In den Grenzstufen habe ich mit Hilfe der binokularen Lupe abgelesen und außerdem noch mikroskopisch auf dem Objektträger kontrolliert. Es hat sich erwiesen, daß die mikroskopische Kontrolle keine höheren Werte ergibt als die mit der Lupe ermittelten. Ich habe die mikroskopische Untersuchung jedoch bei allen Versuchen durchgeführt zum Vergleich mit den anderen Methoden. Die Untersuchung mit der Lupe reicht aber vollständig hin. Außerdem ist sie noch zuverlässiger, da sie in der Kapillare vorgenommen wird, wo die Agglutinate in Bewegung sind und sich besser abheben. Zum Vergleich kann man auch mehrere Kapillaren unter der Lupe nebeneinander betrachten.

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen habe ich an verschiedenen Kurven dargestellt. Die Abbildungen 2 a, 2 b und 2 c zeigen die makroskopischen und mikroskopischen Titerwerte der einzelnen Methoden nebeneinander.

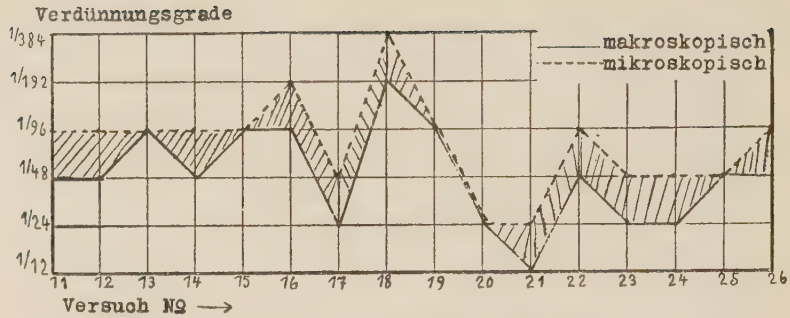

Abb. 2a Objektträgermethode

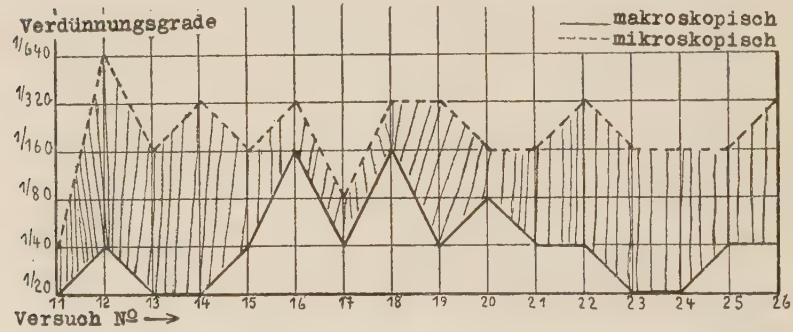

Abb. 2 b. Röhrchenmethode (Schiff).

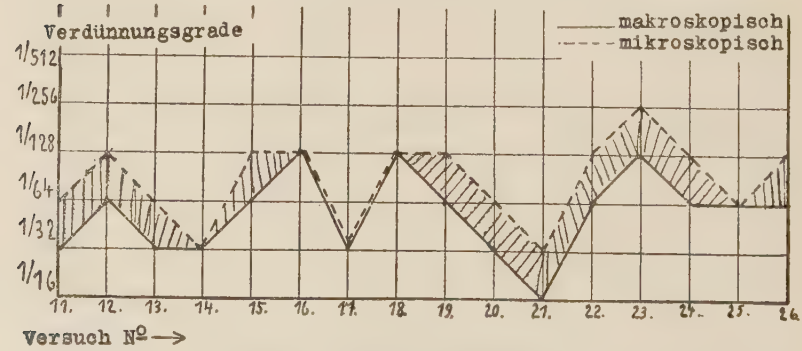

Abb. 2 c. Kapillarmethode

Die Differenz zwischen makroskopischen und mikroskopischen Ergebnissen ist durch Schraffierung deutlicher hervorgehoben. Es fällt hierbei sofort auf, daß die Differenz bei der Schiff'schen Methode am größten ist. Während bei der Objektträger- und der Kapillarmethode der makroskopische und der mikroskopische Wert höchstens um eine Stufe differiert und verschiedentlich sogar zusammenfällt, zeigen sich bei der Schiff'schen Methode Unterschiede von 2, 3 und mehr Stufen. Wir haben sogar bei unseren gemeinsamen Ablesungen vereinzelte Fälle beobachtet, wo makroskopisch nur ein oder zwei

Röhrchen positiv waren, unter dem Mikroskop aber sämtliche angelegten Stufen noch Agglutinate aufwiesen. Diese Versuche konnte ich natürlich nicht verwerten, da ich ja keine negativen Punkte und somit kein Endergebnis ermitteln konnte. Der Grund dafür liegt eben in der schweren Ablesbarkeit im Reagenzglas, was auch schon von zahlreichen Autoren festgestellt worden ist (siehe oben). Durch die Schleuderkraft beim Zentrifugieren werden starke, zum Teil unspezifische Zusammenballungen hervorgerufen. Beim Ablesen müssen diese durch mechanische Einwirkungen bedingten Zusammenballungen wieder aufgeschüttelt werden, wobei — wie schon hervorgehoben — das persönliche Moment eine große Rolle spielt. Bei den beiden anderen Methoden ist das Mischen viel schonender und den natürlichen Vorgängen mehr entsprechend, was in besonderem Maße für die Kapillarmethode gilt.

Da ich mich bei meinen Versuchen zunächst an die in der Literatur für die einzelnen Methoden angegebenen Mengenverhältnisse gehalten habe, erhielt ich verschiedene absolute Werte für die einzelnen Methoden. Das setzt einem genauen Vergleich gewisse Schwierigkeiten in den Weg, zumal in den höheren Stufen, wo diese Unterschiede besonders groß werden. Ich habe daher für die zweite Hälfte meiner Versuche die Mengenverhältnisse so gewählt, daß ich für die entsprechenden Stufen bei allen drei Methoden gleiche absolute Werte erhielt, indem ich immer Serum und Verdünnungsflüssigkeiten zu gleichen Teilen zusetzte, wie es auch Thomsen und Kettel und Lattes getan haben, und wie es auch von Zantop vorgeschlagen wird zur Vereinheitlichung der Methodik. In der Abbildung 3 habe ich in einer Tabelle zusammengestellt, welchen absoluten Verdünnungsgrad man durch verschiedene Arten der Herstellung einer Verdünnungsreihe erhält, um zu zeigen, wie stark die Werte in den einzelnen Stufen auseinandergehen.

	2 Tr. Serum + 2 Tr. NaCl + 1 Tr. Blut	4 Tr. Serum + 4 Tr. NaCl + 1 Tr. Blut	1 Tr. Serum + 1 Tr. NaCl + 2 Tr. Blut	Serum + NaCl + Blut ana.
Stufe I ohne NaCl	1/1,5	1/1,25	1/4	1/2
Stufe II	1/3	1/2,5	1/8	1/4
„ III	1/6	1/5	1/16	1/8
„ IV	1/12	1/10	1/32	1/16
„ V	1/24	1/20	1/64	1/32
„ VI	1/48	1/40	1/128	1/64
„ VII	1/96	1/80	1/256	1/128
„ VIII	1/192	1/160	1/512	1/256
„ IX	1/384	1/320	1/1024	1/512
„ X	1/768	1/640	1/2048	1/1024

Bei der zweiten Versuchsserie habe ich also bei der Objektträgermethode 2 Tropfen Serum + 2 Tropfen NaCl + 2 Tropfen Blutkörperchen zur Herstellung der Verdünnungsreihe gewählt, für die Reagenzglasmethode 4 Tropfen + 4 Tropfen NaCl + 4 Tropfen Blutkörperchenaufschwemmung. Für die Kapillarmethode blieben die Verhältnisse gleich. Daraus ergeben sich also für alle Methoden entsprechend gleiche absolute Werte, die einen direkten Vergleich ohne weiteres ermöglichen.

Es besätigt sich hier, daß auch bei absolut gleichen Bedingungen die einzelnen Methoden für dasselbe Serum verschiedene Agglutinin-

titerwerte ergeben. Es ist also die Methode als solche von Einfluß auf das Ergebnis. Die Schiff'sche Methode ergibt durchschnittlich die tiefsten Werte. Die höchsten Titer weist die Kapillarmethode auf, während die Resultate der Objektträgermethode etwa in der Mitte zwischen diesen beiden liegen. Von einigen kleinen Abweichungen abgesehen, laufen die Kurven jedoch ziemlich symmetrisch. Daraus kann man den Schluß ziehen, daß das eine Verfahren eben bessere Bedingungen für die Reaktion gibt und das Material besser auszuwerten vermag als das andere. Und hier steht also die Kapillarmethode an der Spitze. Diese Verhältnisse zeigt noch deutlicher die Abbildung 4.

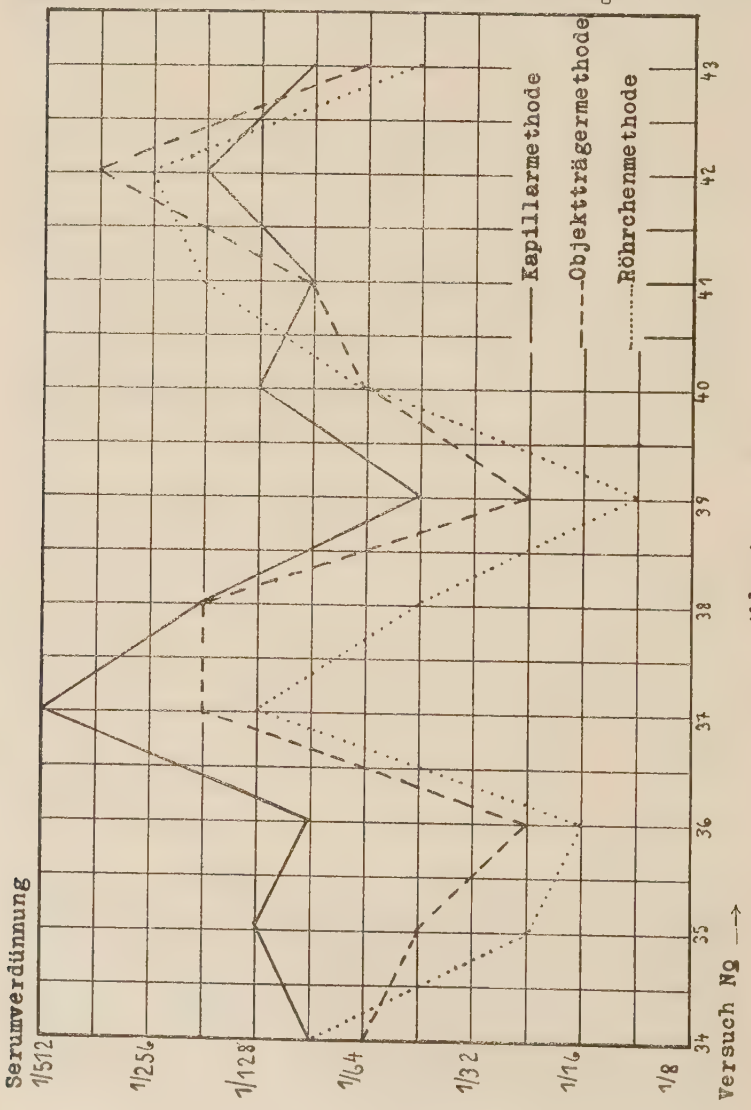

Abb. 4.

Hier habe ich die Mittelwerte zwischen den makroskopischen und mikroskopischen Ergebnissen errechnet und dargestellt. Einen ähnlichen Weg hat z. B. auch Fischer eingeschlagen. Er errechnet aus verschiedenen Ablesungen einen Mittelwert und gibt diesen als Normalwert an. Die Kurven in Abbildung 4 lassen natürlich, da es sich ja um die Mittelwerte handelt, nicht so starke Differenzen zwischen den einzelnen Methoden erkennen wie die vorigen Kurven. Die Höhe der von mir ermittelten Maximaltiter (mikroskopische Werte) ist in der Abbildung 5 eingezeichnet.

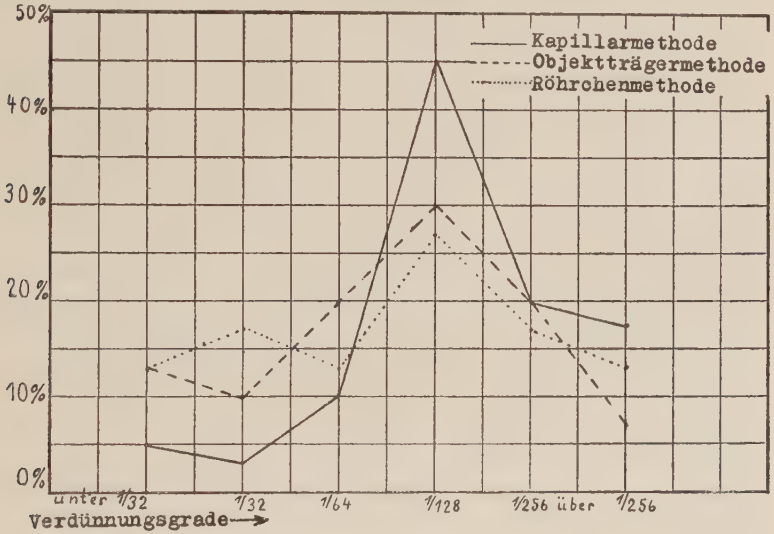

Abb. 5.

Die Kurve besagt, wieviel Prozent der von mir untersuchten Sera bei den einzelnen Verdünnungsstufen ein Maximum erreichten. Der Gipfelpunkt für alle drei Methoden liegt bei einer Serumverdünnung von $^1/_{128}$. Das stimmt auch mit den in der Literatur verzeichneten Durchschnittswerten überein. Bei der Kapillarmethode agglutinierten 45 % bis zur Stufe $^1/_{128}$, bei der Objektträgermethode 30 % und bei der Schiff'schen Methode 27 %. Wir sehen also auch hier, daß prozentual die Kapillarmethode die höchsten und die Schiff'sche Röhrchenmethode die niedrigsten Werte liefert, während die Objektträgermethode etwa die Mitte zwischen diesen beiden hält.

Bei meinen Versuchen habe ich also die Erfahrung gewonnen, daß zum Titrieren die Objektträger- und die Kapillarmethode eher geeignet sind als die Schiff'sche Methode. Die Nachteile der Schiff'schen Methode habe ich oben genügend auseinandergesetzt. Aber gerade die Schiff'sche Methode ist das Verfahren, das bisher von fast allen Untersuchern angewandt worden ist. Das ist sicher mit ein Grund für die Uneinheitlichkeit der Ergebnisse.

Wägen wir nun auch die beiden anderen Methoden gegeneinander aus, so ist zunächst einmal festzustellen, daß diese im Großen und Ganzen ziemlich gleichwertig sind. Das zeigt sich einmal in den sich ziemlich gut entsprechenden Ergebnissen, vor allem aber in der guten Ablesbarkeit und den dementsprechend geringen Schwankungen der

einzelnen Werte. Für die Kapillarmethode ist hier noch zu betonen, daß bei ihr das Ablesen an sich noch leichter ist, wie oben bei der Ablestechnik erklärt ist. Das Objektträgerverfahren hat gegenüber der Kapillarmethode den Vorteil, daß bei ihm eine Versuchsanordnung schneller auszuführen ist. Mit der Objektträgermethode konnte ich einen Versuch in 4 bis 5 Minuten ansetzen, mit der Schiff'schen Methode in 3 bis 4 Minuten (dazu kommt aber noch das Zentrifugieren), während ich bei der Kapillarmethode 6 bis 7 Minuten brauchte. Demgegenüber hat die Kapillarmethode den großen Vorzug, daß dem Objektträger und im Reagenzglas, welch letztere Methode das bei ihr das Reaktionsmaximum schneller eintritt, und das eine Verdunstung bei ihr praktisch keine Rolle spielt. Vor allen Dingen hat aber die Kapillarmethode den beiden anderen Verfahren gegenüber einen großen Vorteil, und das ist der, daß man in der Kapillare mit geringsten Mengen von Material noch titrieren kann. Das ist gerade für forensische Untersuchungen oft von höchster Bedeutung. Diesen Vorteil habe ich auch bei meinen Untersuchungen zu schätzen gelernt, denn mir standen nur geringe Serummengen zur Verfügung, mit deren jeder ich drei Versuche ansetzen mußte. Wenn ich die Versuche auf dem Objektträger und im Regenzglas, welch letztere Methode das meiste Material verbraucht, angestellt hatte, so hatte ich manchmal nur noch Spuren von Serum übrig. Mit der Kapillare gelang es, diesen Rest aufzusaugen und damit zu titrieren. Mit den beiden anderen Methoden wäre es jedoch nicht möglich gewesen, mit einer so kleinen Serummenge einen Versuch anzusetzen. In der Abbildung 7 habe ich nun noch einmal die Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden in Form einer Vergleichstabelle zusammengestellt.

Eigenschaften	Objektträger M.	Röhrchen M.	Kapillar M.
Verdunstung	sehr viel	wenig	gar nicht
Material-erfordernis	im Mittel	am meisten	sehr wenig
Titerschwankungen	gering	groß	gering
Dauer des Ansetzens eines Versuches	mittel	am schnellsten	am längsten
Ablesbarkeit der Grenzwerte	gut	schwierig	am leichtesten

Abb. 7

Zusammenfassung.

a) Um die einzelnen Methoden miteinander vergleichen zu können, wird bei einheitlichen Voraussetzungen und unter gleichen Bedingungen mit der Objektträgermethode, der Schiff'schen Röhrchenmethode und der Kapillarmethode gleichzeitig titriert.

b) Die Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden werden gegeneinander abgewogen und festgestellt, daß die Schiff'sche Röhrchenmethode zum Titrieren nicht so brauchbar ist, daß aber die Objektträger- und Kapillarmethode hierfür sehr gut geeignet sind, da sie zuverlässiger sind. Denn bei ihnen gibt es nicht die großen Schwankungen zwischen makroskopischen und mikroskopischen Werten wie bei der Röhrchenmethode, weil bei diesen die natürlichen Verhältnisse nicht durch äußere Einwirkungen beeinträchtigt werden. Die Ergebnisse sind dabei so eindeutig, daß ein subjektives Moment beim Ablesen nicht vorhanden ist. Weil nun bei der Objektträger- und Kapillarmethode im Gegensatz zur Röhrchenchenmethode diese Schwankungen nicht vorhanden sind, erhalten verschiedene Untersucher entsprechend gleiche Werte, so daß ein Vergleich der Ergebnisse ohne weiteres möglich ist. Eine Standardisierung der Titriertechnik wäre daher wohl durchführbar. Die Objektträger- und die Kapillarmethode werden in Bezug auf die Ergebnisse für ziemlich gleichwertig erachtet. Die Kapillarmethode bietet aber sonst noch einige Vorteile, insbesondere den, daß man mit geringsten Mengen von Material titrieren kann und daß bei ihr das Ablesen besonders leicht ist.

c) Auch bei absolut gleichen Bedingungen ergeben die einzelnen Methoden für dasselbe Serum verschiedene Agglutinintiterwerte. Der Durchschnittswert des Maximaltiters liegt bei allen drei Methoden bei einer Serumverdünnung von 1/128. Die Kapillarmethode ergibt durchschnittlich die höchsten Werte, die Röhrchenmethode die niedrigsten, während die der Objektträgermethode etwa in der Mitte zwischen beiden liegen.

Schrifttum.

Fischer, W.: Über Schwankungen des Isohaemagglutinintiters beim Menschen.
Arb. Staatsinstut exper. Ther. Frankfurt a. M., H. 20, 1927 S. 49—58.

Gerszon, L., Lederfeind, G.: Die Isohaemagglutinine des menschlichen Blutes und ihr Titer unter normalen und pathologischen Bedingungen.
Minerva med. (Torino) 1930, I, S. 315—318. Ref. Ber-Physiol. Bd. 59, 1931, S. 809—810.

Giovanni, Pecorella e C. Angeleri: Über eine Schnellmethode zur Titration von isoagglutinierenden Seren.
Zbl. f. d. ges. Hyg. Bd. 25, 1931, 1/2, S. 92.

Hölscher, F.: Untersuchungen über den Blutgruppentiter bei fortgeschrittener Tuberkulose.
Zeitschr. f. Immun. forschg. Bd. 66, 1930, 3/4 S. 193—203.

Holzer, F. J.: Ein einfaches Verfahren zur Gruppenbestimmung an vertrocknetem Blut durch Agglutininbindung.
Deutsche Zeitschr. f. d. ges. gerichtl. Med., 1931, Bd. 16 S. 445.

Kettel, K. u. Thomsen, O.: Quantitative Untersuchungen über die menschlichen Isoagglutinine Anti-A und Anti-B.
Zeitschr. f. Immun. forschg. Bd. 65, 1930, 3/4, S. 245—253.

Lattes, L.: Die Individualität des Blutes.
Berlin, J. Springer, 1925.

Lauer, A.: Zur Kenntnis der erblichen Blutstrukturen.
Deutsche Zeitschr. f. d. ges. gerichtl. Med., Bd. 11, 1928 S. 264.

Lehmann, K.: Untersuchungen über die Konstanz des menschlichen Isoagglutinintiters bei Gesunden und Kranken.
Acta pathol. et mikrobiol. scand. (Kobenh.) Bd. 5, 1928, 2/3 S. 155—169.

Pikkarainen, J. und Suominen: Über die Bestimmung des Isoagglutinintiters.
Zeitschr. f. Immun. forschg., Bd. 78, 1933, S. 145—151.

Ponsold, A.: Die Bestimmbarkeit der Blutgruppenzugehörigkeit an frischem Blut im Glaskapillarröhrchen.
Münch. med. Wochenschr. 1933, Nr. 41, S. 1594.
Eine Mikromethode zur quantitativen Auswertung kleinster Serummengen. Die Bestimmung des Agglutiningehaltes mittels Kapillarröhrchen.
Deutsche Zeitschr. f. d. ges. gerichtl. Med., Bd. 23, H. 1 1934.

Roth, H. W.: Die gelegentliche Bedeutung der Agglutinintiterhöhe bei gerichtlichen Blutgruppengutachten im Strafprozeß.
Ärztl. Sachverst. ztg. 37, 1931, 8 S. 115—117.

Rubaschkin: Die vergleichende Beurteilung der Methoden der Haemoisoagglutination.
Vrač. Delo (russ.) 1925, Nr. 10—11.

Schiff, F. und Hübener, G.: Quantitative Untersuchungen über und Gerichtsärzte.
Berlin, J. Springer, 1932.

Schiff, F. und Hübener, G.: Quantitative Untersuchungen über die Empfindlichkeit menschlicher Erythrocyten für Isoagglutinine.
Zeitschr. f. Immun. forschg. Bd. 45, 1925, S. 207—222.

Schiff, F. und Mendlowicz, L.: Quantitative Untersuchungen über Isoagglutinine mit besonderer Berücksichtigung der Leukämie.
Zeitschr. f. forschg. Bd. 48, 1926, H. 1 S. 1—22.

Schoett, E. D.: Die Technik der Blutgruppenbestimmung.
in P. Steffan: Handbuch der Blutgruppenkunde, München, J. F. Lehmanns Verlag, 1932.

Schrader, G.: Untersuchungen zur Frage der Blutgruppenänderung.
Zeitschr. f. Rassenphysiol. Bd. 3, 1931, S. 108.

Shigeno, S.: Quantitative Untersuchungen über die Empfindlichkeit menschlicher Erythrocyten für gruppenspezifische Agglutinine
Zeitschr. f. forschg. Bd. 66, 1930, S. 403—423.

Thomsen, O. und Kettel K.: Die Stärke der menschlichen Isoagglutinine und entsprechenden Blutkörperchenrezeptoren in verschiedenen Lebensaltern.
Zeitschr. f. Immun. forschg. Bd. 63, 1929, S. 67—92.

Weber, H. E.: Untersuchungen über die Veränderlichkeit des Agglutinationstiters von menschlichem Serum und menschlichen Blutkörperchen nach Narkosen und Operationen.
Hannover (Helwingsche Verlagsh.) 1930, S. 17.

Weitzner, G.: Haemagglutiningehalt des Blutes Karzinomkranker.
Med. Klinik Jg. 21, 1925, S. 1960—61.

Wellisch, S.: Die Stufenlehre (Gradationstheorie) in der exakten Erbkunde und Blutgruppenforschung.
Zeitschr f. Rassenphysiol. Bd. 1, H. 3/4, 1929.

Zantop, H.: Untersuchungen über den Blutgruppentiter bei Tuberkulose.
Zeitschr. f. Immun. forschg. Bd. 68, 1930, S. 277—285.

Lebenslauf.

Als Sohn des praktischen Arztes Dr. Max Eckhard wurde ich, Karl-August Eckhard, am 23. Januar 1910 in Oberramstadt (Hessen) geboren. Ich absolvierte das Ludwig-Georgs-Gymnasium zu Darmstadt und bestand am 20. Februar 1929 das Abiturientenexamen. Darauf wandte ich mich dem Studium der Medizin an der Universität Würzburg zu, wo ich am Schluß des 5. Semesters das Physikum bestand. Nach weiteren drei Semestern in Würzburg ging ich auf die Universität Halle/S. über, wo ich im Herbst 1934 die medizinische Staatsprüfung ablegte. Jetzt bin ich als Medizinalpraktikant an der Univ. Frauenklinik Halle/S. tätig.

Am Schlusse meiner Arbeit möchte ich nicht verfehlen, Herrn Prof. Dr. Walcher für die freundliche Überlassung des Themas und die Anleitung bei der Abfassung der Arbeit meinen herzlichsten Dank auszusprechen.